

Rec'd 10 19 JUN 2003

10/522137

PCT/JP 03/09142

日本国特許
JAPAN PATENT OFFICE

REC'D 08 AUG 2003 180703

WIPO

PC

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日

Date of Application:

2002年 7月19日

出願番号

Application Number:

特願2002-211462

[ST.10/C]:

[JP2002-211462]

出願人

Applicant(s):

独立行政法人産業技術総合研究所

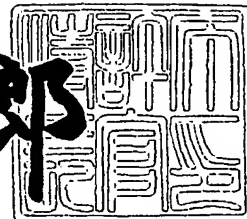
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 6月 6日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3044436

【書類名】 特許願

【整理番号】 419Q02021

【提出日】 平成14年 7月19日

【あて先】 特許庁長官 及川 耕造殿

【国際特許分類】 G01N 33/00

【発明者】

【住所又は居所】 佐賀県鳥栖市宿町字野々下 8 0 7 番地 1 独立行政法人
産業技術総合研究所九州センター内

【氏名】 山下 健一

【発明者】

【住所又は居所】 佐賀県鳥栖市宿町字野々下 8 0 7 番地 1 独立行政法人
産業技術総合研究所九州センター内

【氏名】 前田 英明

【発明者】

【住所又は居所】 佐賀県鳥栖市宿町字野々下 8 0 7 番地 1 独立行政法人
産業技術総合研究所九州センター内

【氏名】 清水 肇

【発明者】

【住所又は居所】 佐賀県鳥栖市宿町字野々下 8 0 7 番地 1 独立行政法人
産業技術総合研究所九州センター内

【氏名】 宮崎 真佐也

【発明者】

【住所又は居所】 佐賀県鳥栖市宿町字野々下 8 0 7 番地 1 独立行政法人
産業技術総合研究所九州センター内

【氏名】 中村 浩之

【発明者】

【住所又は居所】 佐賀県鳥栖市宿町字野々下 8 0 7 番地 1 独立行政法人
産業技術総合研究所九州センター内

【氏名】 山口 佳子

【特許出願人】

【識別番号】 301021533

【氏名又は名称】 独立行政法人産業技術総合研究所

【代表者】 吉川 弘之

【代理人】

【識別番号】 100071825

【弁理士】

【氏名又は名称】 阿形 明

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 マイクロ流路利用分子分析方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 検体分子含有溶液と複合体形成用分子含有溶液とを層流を形成させながらマイクロ流路に流し、層流中における検体分子と複合体形成用分子との間で形成される複合体の拡散度の変化を検出し、解析することを特徴とする分析方法。

【請求項 2】 複合体形成用分子として、蛍光性を有するものを用い、蛍光度の強弱により形成された複合体の拡散度の変化を検知する請求項 1 記載の分析方法。

【請求項 3】 形成された複合体の拡散度をあらかじめ形成された検量線と対比することにより検体分子の濃度を定量する請求項 1 又は 2 記載の分析方法。

【請求項 4】 検体分子が特定配列をもつ DNA 断片である請求項 1、2 又は 3 記載の分析方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、マイクロ流体システムを利用して特定分子の定性又は定量分析を行う方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

遺伝子分野の研究においては、ヒトゲノムの配列解読がほぼ終了し、その成果を基に遺伝子発現、突然変異、一塩基多型などに係わる遺伝子の特定やその機能解析、さらにそれに伴うタンパク質の構造や機能の解析に研究の中心が移りつつある。

他方において、これら一連の研究成果を利用して、医療面、福祉面に役立たせるための技術開発も進められている。

【0003】

ところで、このような研究に関連して開発された手法の 1 つに、生体分子のよ

うな検体分子をそれと複合体を形成する分子（以下プローブ分子という）との間の相互作用を利用して検出する方法がある。この方法は、固相担体上に固定化されたプローブ分子が生体分子と特異的な相互作用により形成する複合体を、あるかじめラベル化しておいた蛍光物質や電気化学活性物質の発する信号により検出して生体分子の存在を定性的に検知したり、その定量を行うものである。

【0004】

そして、この際の生体物質の検出方法としては、これまでに例えば、電気化学反応を利用する方法[「アナリティカル・ケミストリー (Anal. Chem.)」, 第72巻, 第1334~1341ページ(2000)]、水晶振動子を利用する方法[「ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・ケミカル・ソサエティ (J. Am. Chem. Soc.)」, 第114巻, 第8299~8300ページ(1992)]、表面プラズモン共鳴を利用する方法(シュプリンガー・フェアラーク東京株式会社, 1998年発行, 永田, 半田共著, 「生体物質相互作用のリアルタイム解析実験法」)などが知られている。

【0005】

これらは、いずれも金表面に核酸断片やタンパク質などをプローブ分子として固定し、それと特異的な相互作用をもつ生体物質又はその関連物質を結合させ、その際に生じる電気化学的応答、水晶振動子の振動数変化、表面プラズモンによる屈折率変化を検知し、分析するものである。

【0006】

しかしながら、これらの方法において高い精度で定量を行うには、固相担体上に固定化するプローブ分子の厳密な制御が必要とされるが、固相担体上へのプローブ分子の固定化効率の不均一性、低再現性、固液界面での物質拡散挙動の複雑性及び検体分子を作用させる際の作業者の熟練度の不足などにより、限界を生じるのを避けられなかった。

【0007】

その他、プローブ分子又は検体分子のいずれも固相担体に固定化しないで行う手法もいくつか知られている。このようなものとしては、例えばポリメラーゼ連鎖(PCR)反応を利用する方法[「プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル

ル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユナイテッド・ステイツ・オブ・アメリカ (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)」、第94巻、第10756ページ(1997)」、モレキュラービーコンを利用する方法[「アナリティカル・ケミストリー (Anal. Chem.)」、第72巻、第747A～753Aページ(2000)]などがある。

【0008】

しかしながら、PCR反応を利用する方法は、そのPCR反応自体が指数関数的に増幅される反応であるため、精度の高い定量を行うことは原理的にむずかしい。

また、モレキュラービーコンを利用する方法、すなわち蛍光部位と消光部位をプローブDNAの両末端に導入したものは、被検分子との複合体形成前は、自己相補配列をとるために折れ曲がって蛍光が消光するが、複合体形成後はプローブ分子により発光する性質を有することを利用して分析する方法である。

しかしながら、この方法を行うには、プローブDNAの配列設計に制限がある上に、DNAやその他の核酸の分析にしか適用できないという欠点がある。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、このような事情のもとで、従来の固相担体に検体分子又はプローブ分子を固定して分析する方法がもつ欠点を克服し、操作が簡単で、より高い精度が得られる新規な検体分子、例えば生体物質の分析方法を提供することを目的としてなされたものである。

【0010】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、プローブ分子と検体分子との複合化を利用して、検体分子の定性、定量分析を行う方法について鋭意研究を重ねた結果、プローブ分子含有溶液と検体分子含有溶液とをマイクロ流路に流した場合、その両者が層流を形成し、たがいに混ざり合わない性質を有すること、したがって、両者の選択的相互作用の強弱によって、拡散度の差異を検出することにより固相担体への固定化なしに、しかも高い精度で生体分子のような検体分子を分析しうることを見出し、この

知見に基づいて本発明をなすに至った。

【0011】

すなわち、本発明は、検体分子含有溶液と複合体形成用分子含有溶液とを層流を形成させながらマイクロ流路に流し、層流中における検体分子と複合体形成用分子との間で形成される複合体の拡散度の変化を検出し、解析することの特徴とする分析方法、この方法において複合体形成用分子として、蛍光性を有するものを用い、蛍光度の強弱により形成された複合体の拡散度の変化を検知する方法、及び形成された複合体の拡散度をあらかじめ形成された検量線と対比することにより検体分子の濃度を定量する方法を提供するものである。

【0012】

【発明の実施の形態】

本発明方法は、マイクロ流路にプローブ分子含有溶液と検体分子含有溶液とを層流を形成させながら同時に流し、流れる間に両者の間の特異的相互作用により形成される複合体の各層流への拡散度が、その複合化の強弱によって変化するのを、プローブ分子の発する信号により検知し、その結果を解析することにより検体の分析を行うものである。

【0013】

本発明方法で用いるマイクロ流路は、不活性材料基板上に設けられていることが必要である。この不活性材料とは、プローブ分子や検体分子や使用される溶媒及び生成する複合体に対し、反応性を示さない材料のことであり、例えばガラス、石英、又はシリカ、 Si/SiO_2 、マグネシア、ジルコニア、アルミナ、アパタイト、窒化ケイ素、及びチタン、アルミニウム、イットリウム、タングステンのような金属の酸化物、炭化物、窒化物、ホウ化物、ケイ化物などのセラミックスを挙げることができる。

このほか上記の要件を満たすものである限り、金属、プラスチックなども用いることができる。このベースの形状としては、板状体が普遍であるが、所望ならば弧状体、球体、粒体などのものを用いることができる。

【0014】

これらの材料は、選択する手段、検体及びプローブ分子の種類、溶媒に応じて

適宜選択されるが、光学的手段で検出する場合は、少なくとも検出部位においては使用する光の波長に対し、十分な透明性を示すものを用いる必要がある。

【0015】

本発明におけるマイクロ流路は、これらの不活性材料基板に、幅10～500 μm 、好ましくは50～400 μm 、深さ10～500 μm 、好ましくは50～400 μm のサイズで刻設される。このマイクロ流路の長さには特に制限はなく、使用される不活性材料のサイズに依存するが、通常100～300 mmの範囲で選ばれる。

【0016】

このようなマイクロ流路は、例えばマイクロドリルのような工作機械を用いる機械的手段により基板上に刻設するか、あるいは半導体集積回路製造などに用いられる光リソグラフィー技術により溝を形成させた後、別の基板を接着することにより製造することができる。このような極細の流路を流れる流体は、たがいに可溶な溶媒であっても混ざり合うことなく、層流を形成したまま流れていく。また、このような極細の流路は、物質の拡散距離が短いという特徴を有している。

【0017】

一般にマイクロ流路を流れる2液の界面では、溶質は、溶媒に可溶であれば、もう一方の溶液のほうへ自然に拡散していくが、プローブ分子と検体分子との間に特別な相互作用がある際には、その拡散がさらに加速される。

【0018】

本発明方法は、この現象を利用した分析方法であって、プローブ分子に導入した官能基の発する信号、もしくはプローブ分子自体の持つ特異的な特性（特定波長の光の吸収など）、もしくは形成された複合体に選択的に結合する物質の発する信号や特性を検出することで、自然拡散に上乗せされた余分の拡散量を知ることができ、その量により、検体の分析を行うものである。

【0019】

したがって、本発明方法は、プローブ分子と検体分子との間に特異的な相互作用が生じるような場合において、一般的に利用することができる。例えば、プローブとして核酸断片を用いれば、特異的配列を持つ核酸断片の検出や分析に用い

ることができる。例えばプローブとしてタンパク質を用いる場合には、特定の抗体を検出することができるし、プロテアーゼ阻害活性を有するような各種ペプチドをプローブとして用いた場合には、特定の酵素の検出やその活性の評価を行うことができる。また、各種糖をプローブとして用いた場合には、それを特異的に認識する核酸やタンパク質を検出、定量することができるし、各種細胞をプローブとして用いた場合には、種々の天然又は人工薬剤、環境物質などの生体への影響をスクリーニングすることができる。

【0020】

本発明方法では、これらに限らず、プローブ分子と検体分子との間に特異的相互作用を生じるような組合せを選択すれば、あらゆる化合物の検出に利用することができる。また、上記の例では、化学的な意味での単一分子が用いられているが、これ以外にも細胞などやその他の物質一般への展開が可能である。

【0021】

次に、本発明方法において、プローブ分子と検体分子との間の複合体形成については、従来の方法のように作業者の熟練を必要とすることはない。

また、本発明方法では、プローブ分子と検体分子の複合体形成に関しても、作業者の熟練度の差による分析結果の不確実性を排したものとすることができる。従来法では、例えば核酸断片検出の際のハイブリダイゼーション操作のような、プローブ分子と検体分子の複合体形成のための実験操作が必要となり、この実験操作における作業者の熟練度の差によってもたらされる分析結果の不確実性が問題となっていた。

これに対し、本発明方法では、注射器などで溶液を流路内に流し込むだけであるため、熟練度は無関係であり、シリンジポンプなどの器具を用いれば、さらに作業者の熟練度の差を排することができる。

【0022】

さらに、本発明方法においては、プローブ分子の分子数が少なくても、微小空間内での処理のため、その濃度を高く保つことができ、プローブ分子の発する特異的な信号の密度を高めることができる。したがって、本発明方法によれば、高感度の検出を行うことができる。

【 0 0 2 3 】

次に、本発明方法における検出に要する時間は、送液した溶液が流路を流れるのに要する時間であるが、数百 μm 程度の大きさの極細の流路を流れるのに要する時間は、たとえその送液量が少なくとも短いものであり、そのため本発明方法における検出に要する時間は当然短くなる。この時間は、使用するマイクロ流路の寸法などに左右されるが、通常数秒以内である。

【 0 0 2 4 】

本発明方法は、層流中における検体分子とプローブ分子との間で形成される複合体の拡散度の変化に基づいて検体分子の定性的又は定量的な分析を行うものである。すなわち、検体分子とプローブ分子との間の親和性がない場合には、両者は単に通常の混合挙動に基づく層流間の拡散度が検出されるだけであるが、両者の間で親和性を有する場合には、複合体が形成される分、層流中の拡散が促進され、増大された拡散度として検出される。したがって、このような拡散度の違いを対比することによって、プローブ分子に対する検体分子の作用を定性的に知ることが可能である。

【 0 0 2 5 】

そして、上記の検出は、測定しやすいということから、通常検体分子溶液側へ拡散するプローブ分子の量を直接測定するか、あるいはプローブ分子溶液側のプローブ分子の量を測定することにより行われる。そして、この測定は、プローブ分子に付した特徴的な信号をセンサーで検出することにより行われるが、特にプローブ分子として蛍光性官能基を導入して蛍光性を付与したものをを用い、その蛍光度の強弱を追跡して生成する複合体の拡散度の変化を求めるのが有利である。

【 0 0 2 6 】

そのほか、プローブ分子として、電気化学活性官能基を導入したものをを用い、その電流量の変化を求める方法や、プローブ分子のもつ特異的な紫外光、可視光又は赤外光に対する吸収強度を測定する方法なども利用可能である。

このようにして、プローブ分子に特異的な信号を得るための化学修飾を施すことなく、検体分子の分析を行うことができる。

【 0 0 2 7 】

また、複合体の拡散度の測定に先立って、あらかじめ知られた量について検量線を作成しておき、次いで検出結果をこれと対比すれば検体分子の濃度の定量、すなわち質量分析することもできる。

【0028】

以上は、検体分子溶液側へ拡散したプローブ分子の量を測定する場合であるが、所望ならばプローブ分子溶液側へ拡散した検体分子とプローブ分子との複合体を測定して、検体分子の量を検出することもできる。

このように、本発明方法における検出手段には、特に制限はなく、プローブ分子と検体分子との複合体の拡散状況が分るものであればどのような手段でもよい。

【0029】

次に、本発明方法において、マイクロ流路に溶液を送液するには、例えば注射器を接続し、手動で行うことも可能であるが、シリンジポンプなどの機械的手段により送液速度、送液圧力などを制御しながら行うのが有利である。

【0030】

例えば、マイクロ流路に検体分子溶液とプローブ分子溶液を同時に送液し、ある一定距離流路を通過した後、検出操作を行う。ここでは、検体分子溶液とプローブ分子溶液とは少なくとも1種類ずつ必要であるが、複数の溶液を同時に流すことにより、複数の情報を同時に得ることも可能である。この際の検出は、例えば蛍光法で行う場合、検出部位にレーザー光又はその他の励起光源からの光を照射し、そこから発せられる蛍光の強度を測定する。検体溶液側から出る蛍光が強いほどプローブ分子の存在量が多いということであり、すなわちプローブ分子と検体との相互作用の強さを反映したものとなる。このようにして、目的の検体の有無や存在量を知ることができる。

【0031】

次に、所定の配列のDNAの検出を蛍光性官能基を導入したプローブ分子を用いて行った場合を例として、具体的に説明する。

すなわち、検体DNA断片溶液と、プローブである蛍光性官能基導入DNA断片溶液を、マイクロ流路に送液する。ある一定距離流路を流れた後、サンプル溶

液側にレーザー光などの励起光を照射する。そこから発せられる蛍光がないか弱いものであれば、プローブDNA断片と検体DNA断片の配列相補性はないものと判断される。逆にそこで検出される蛍光が強ければ、プローブDNA断片と検体DNA断片の配列相補性があると判断される。

【0032】

この際、未知試料を検定する前に、既知試料について蛍光強度と相補性の度合いを調べておくことでより正確に分析することができると同時に、相補配列を持つDNA断片の量を定量することができる。

【0033】

この場合、プローブ分子としてのDNAに代えて、DNA結合性ペプチド（DNAに類似した構造を持つペプチドで、DNAよりも配列認識能が高い）又はLNA（DNAのリボース環2'位と5'位を連結したもので配列認識能が高い）を使用することにより、さらに精度の高い分析を行うことが可能となる。また、PNAはDNAとは異なり、水以外の有機溶媒にも可溶であり、検体を水溶液とし、プローブPNAを有機溶媒に溶かして使用することにより、検体のプローブ溶液側への拡散を抑えることができ、さらに精度の高い分析を行うことが可能となる。

【0034】

【実施例】

次に、本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの例によりなんら限定されるものではない。

なお、マイクロ流路としては、図1に示すように、横70mm、縦30mmの亚克力樹脂板に、幅360 μ m、深さ200 μ mのチャンネルをマイクロドリルにより刻設したものをを用いた。

【0035】

実施例1

プローブDNAとして、構造式F-(5')-AGGCTGCTCCCCGC GTGGCC-(3')（ただしFはフルオレセイン）で表わされる5'末端に蛍光物質のフルオロセインを導入したDNA断片を調製した。

また、試料DNAとして、構造式(5′)-GGCCACGCGGGGAGCAGCCT-(3′)(以下、試料1と称する)及び構造式(5′)-AAAAAAAAAAAAAAAAA-(3′)(以下、試料2と称する)で表わされる2種類のDNA断片を準備した。

これら3種のDNA断片の溶液とともにDNA断片を含まない溶液(以下、ブランク溶液と称する)の、計4種類の溶液を調製した。溶液は、1 pmol/μl DNA、5 mMリン酸緩衝液(pH 7.0)、50 mM塩化ナトリウムの溶液組成である。

次いで、これらのプローブDNA溶液と試料1溶液、プローブDNA溶液と試料2溶液、プローブDNA溶液とブランク溶液の、3つの組合せをマイクロ流路に送液速度20 μl/minで送液した。

【0036】

次に、図1中のAの場所における検体流路側にアルゴンガスレーザーの発する488 nmの光を照射することにより蛍光を発生させ、その強度を比較した。その結果を棒グラフとして図2に示す。このグラフは、10回測定した蛍光強度(任意単位)の平均値であり、標準偏差の範囲をエラーバーにて示した。プローブDNA断片と相補的な塩基配列のサンプル1の場合のみ、ほかの2つの比較対照の場合よりも特に大きな蛍光応答を得た。この結果から、特別な相互作用を持つものが、その相互作用によって拡散が加速されることを利用して、分析可能であることが分る。また、その測定結果は、変動係数にして3%程度であり、極めて高い再現性を示していた。

【0037】

実施例2

プローブDNA溶液として、構造式F-(5′)-AGGCTGCTCCCCGCGTGGCC-(3′)(ただしFはフルオレセイン)で表わされる5′末端にフルオレセインを導入したDNA断片を、1 pmol/μl、500 fmol/μl、300 fmol/μl、100 fmol/μl、50 fmol/μl、30 fmol/μl、10 fmol/μl、5 fmol/μl、3 fmol/μl、1 fmol/μlで含む10種類の5 mMリン酸緩衝液(pH 7.0)と

5 0 m M 塩化ナトリウム水溶液との混合液を調製した。

また、別に DNA 断片を含まない 5 m M リン酸緩衝液 (p H 7. 0) と 5 0 m M 塩化ナトリウム水溶液との混合液を調製した。

これらの試料を図 1 に示す形状のマイクロ流路にシリンジポンプにより送液速度 $20 \mu \text{l} / \text{min}$ で送液した。

【0038】

次いで、図 1 中の A の場所におけるプローブ DNA 流路側にアルゴンガスレーザーの発する 488 nm の光を照射することにより蛍光を生じさせ、その強度とプローブ DNA 濃度の関係を求めた。その結果をグラフとして図 3 に示す。図 3 は、10 回測定した蛍光強度 (相対値) の平均値とプローブ DNA 濃度との関係を示したものである。

次に、実際レーザー光の照射される体積と溶液の濃度から計算したプローブ DNA の絶対量を計算し、下欄に併記した。プローブ DNA の濃度、すなわちプローブ DNA の存在量の増加にしたがって、得られた蛍光強度も強くなっており、その両変数の間には高い相関性が認められた。その検出下限は、流路の設計その他により異なるが、本実施例においては 10 a m o l 程度であった。

【0039】

【発明の効果】

本発明によると、固相担体に固定することなしに、単にプローブ含有溶液と検体含有溶液を層流としてマイクロ流路に送液し、所定の位置でプローブ分子と検体分子との複合体の濃度として検出される拡散度を測定するだけで、高い精度により検体の定性及び定量分析を行うことができる。しかも、本発明方法は単純な操作で行われるため、作業者の熟練度の差による分析結果の誤差を最小限に抑制することができる上、適用しうる検体の分子種に制限がなく、広い範囲に応用することができるという利点がある。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 本発明方法で用いるマイクロ流路の 1 例を示す平面図。

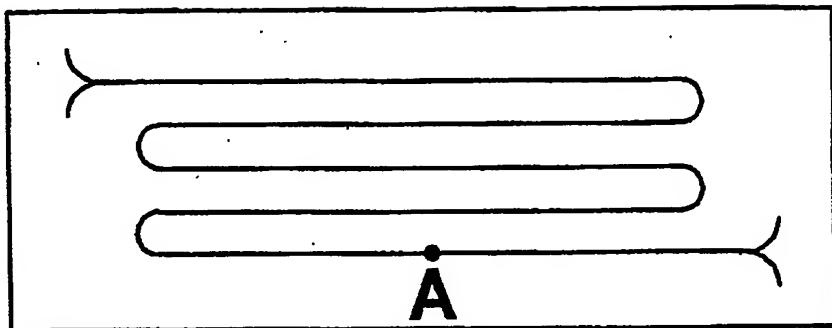
【図 2】 実施例 1 の結果を示す棒グラフ。

【図 3】 実施例 2 におけるプローブ DNA 濃度とその蛍光強度との関係を

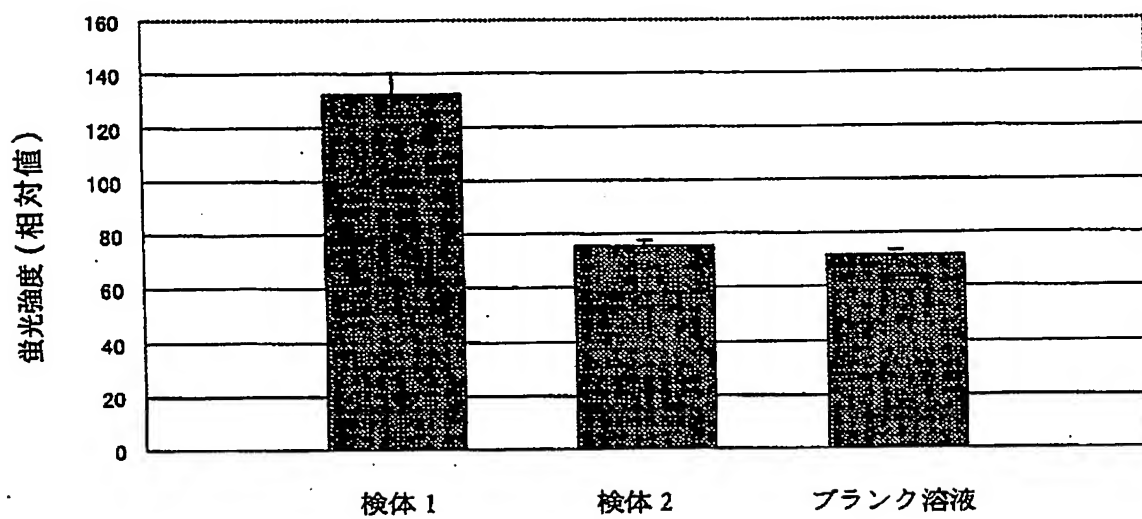
示すグラフ。

【書類名】 図面

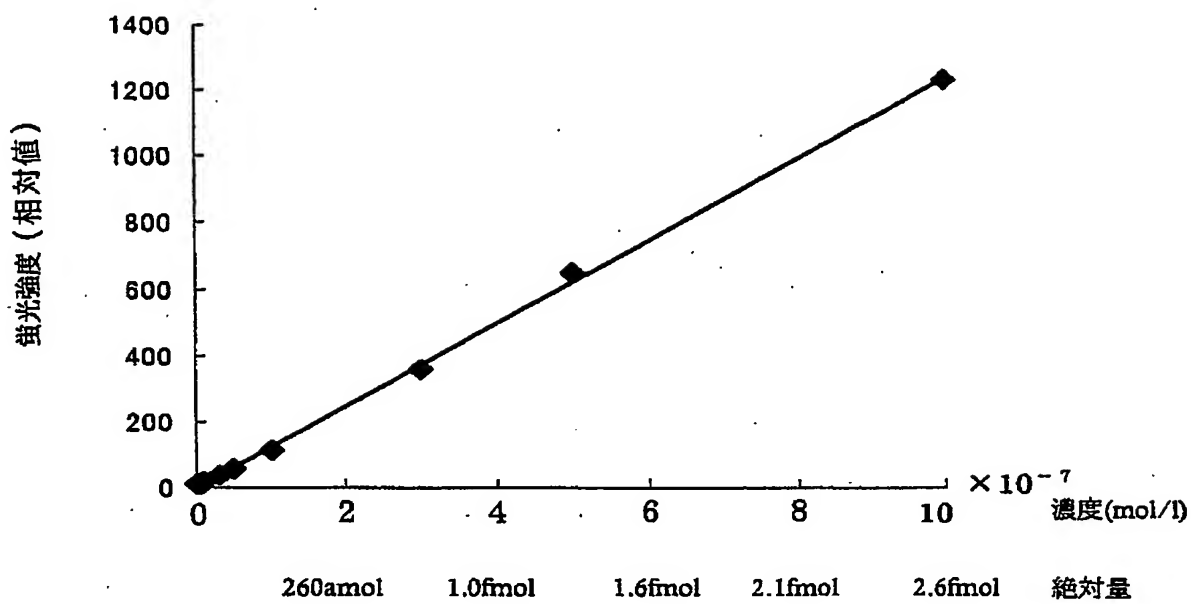
【図 1】



【図 2】



【図 3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 操作が簡単で、より高い精度が得られる新規な検体分子、例えば生体物質の分析方法を提供する。

【解決手段】 検体分子含有溶液と複合体形成用分子含有溶液とを層流を形成させながらマイクロ流路に流し、層流中における検体分子と複合体形成用分子との間で形成される複合体の拡散度の変化を検出し、解析する分析方法、この方法において複合体形成用分子として、蛍光性を有するものを用い、蛍光度の強弱により形成された複合体の拡散度の変化を検知する方法、及び形成された複合体の拡散度をあらかじめ形成された検量線と対比することにより検体分子の濃度を定量する方法である。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [301021533]

1. 変更年月日	2001年 4月 2日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都千代田区霞が関1-3-1
氏 名	独立行政法人産業技術総合研究所